

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-253168

(43)Date of publication of application : 21.09.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
 C07K 14/195  
 C12N 1/21  
 C12N 9/88  
 C12P 13/02  
 //(C12N 15/09  
 C12R 1:01 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )

(21)Application number : 10-065520

(71)Applicant : MITSUI CHEM INC

(22)Date of filing : 16.03.1998

(72)Inventor : ITO KIYOSHI  
 TSURUOKA MIYUKI  
 SUZUKI TADASHI  
 SHISHIMARU SEIYA  
 NAKAMURA TAKESHI

(54) PROTEIN INVOLVING IN ACTIVATION OF NITRILE HYDRATASE, AND GENE CODING FOR THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a protein which allows efficient production of an amide from a corresponding nitrile by contributing to activation of a nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095.

SOLUTION: This protein contributes to activation of a nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095, and consists of an amino acid sequence shown by formula I. It is preferable to produce an amide from a corresponding nitrile by culturing a transformant which carries a recombinant plasmid having a gene coding for the protein, or a base sequence at position 1328-1762 shown by formula II, followed by contacting cells of the transformant obtained by culturing, culture broth, and a material obtained by treating these, with a nitrile (e.g. acetonitrile) in an aqueous medium.

Met Ser Ala Gly Ala Lys Val Arg Asp Lys His Cys Pro Thr Ala Glu  
 5 10 15  
 Asp Arg Ala Ala Asp Ala Leu Asp Ala Glu Lys Pro Gln Asp  
 20 25 30  
 Arg Gln Arg Thr Thr Gly Val Asp Asn Asn Pro Pro Asn Lys Lys His  
 35 40 45 50 55 60  
 His Gly Pro Glu Leu Glu Thr Val Ala Val Lys Pro Ala Val Arg Ser  
 65 70 75 80 85 90 95 100

CGACGCGACG CCGCCATGCG CCGACGTCGCG CCGACGTCGCG CCGACGTCGCG CCGACGTCGCG 61  
 ATGACGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG 126

CGCGTCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG 1742  
 CCGCCGTCGCG CCGCCGTCGCG CG 1765

II

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.04.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 19.11.2002

[Kind of final disposal of application other than the  
 examiner's decision of rejection or application converted  
 registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3408737

[Date of registration] 14.03.2003

[Number of appeal against examiner's decision of  
 rejection] 2002-24319

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-253168

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月21日

(51) Int. Cl.<sup>9</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 K 14/195

C 0 7 K 14/195

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

9/88

9/88

C 1 2 P 13/02

C 1 2 P 13/02

審査請求 有 請求項の数12 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-65520

(22) 出願日

平成10年(1998) 3月16日

(71) 出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 伊藤 潔

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

(72) 発明者 鶴岡 みゆき

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

(72) 発明者 鈴木 正

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニトリルヒドラターゼの活性化に關与するタンパク質及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM 3095 (*Pseudonocardia thermophila* JCM3095) 由来のニトリルヒドラターゼの活性化に關与するニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子を有する組換えプラスミドを構築し、該組換えプラスミドで大腸菌を形質転換し、該大腸菌内でニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子と共に発現させる。

【効果】 遺伝子工学的な手法で該酵素を大量に発現させることが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (*Pseudonocardia thermophila* JCM3095) 由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与することを特徴とするタンパク質。

【請求項2】 配列表の配列番号：1記載のアミノ酸配列により構成されることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (*Pseudonocardia thermophila* JCM3095) 由来であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載のタンパク質。

【請求項4】 請求項1から請求項3に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項5】 配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列で表される請求項4に記載の遺伝子。

【請求項6】 請求項4または請求項5に記載の遺伝子を含んでいることを特徴とする組換えプラスミド。

【請求項7】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項6に記載の組換えプラスミド。

【請求項8】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子がシュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (*Pseudonocardia thermophila* JCM3095) 由来であることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項9】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子が配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で表される $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項10】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子が配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で表される $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項11】 請求項6から請求項10に記載のいずれかの組換えプラスミドを保持する形質転換株。

【請求項12】 請求項7から請求項10に記載のいずれかの組換えプラスミドを保持する形質転換株を培養し、培養によって得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物とニトリル化合物とを水性媒体中で接触させて該ニトリル化合物に対応するアミド化合物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (*Pseudonocardia thermophila* JCM3095、以下単にシュードノカルディア・サーモフィラと呼ぶ) 由来のニトリルヒドラターゼの活

性化に関与するタンパク質及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに、本発明は、該遺伝子を含有する組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株及び該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、種々の化合物のニトリル基を水とアミド基に変換するニトリル水と活性を有する酵素であるニトリルヒドラターゼが発見され、該酵素を産生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラターゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げるのが重要であり、より具体的には単位微生物重量あたりの該酵素含有量を高くする必要がある。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みが検討されている。

【0003】 本発明者らは、ニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物としてシュードノカルディア・サーモフィラを見出した(特開平8-56684)。また、本発明者らは、同株よりニトリルヒドラターゼを単離し、同酵素が $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニットより構成されることを確認した。さらに、同株よりニトリルヒドラターゼ遺伝子を単離し、そのアミノ酸配列および遺伝子配列を明らかにするとともに、該遺伝子を大腸菌内で大量に発現できる遺伝子組換えプラスミドおよび同プラスミドにより形質転換された形質転換大腸菌株を作出することにも成功している(特開平9-275978)。尚、シュードノカルディア・サーモフィラであるが、本菌株は理化学研究所微生物系統保存施設(埼玉県和光市広沢2-1)に番号JCM3095として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、特開平9-275978記載のシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼを大腸菌内で大量に発現させることが可能な遺伝子組換えプラスミド(pPT-DB1)の詳細な解析により判明した該酵素の活性化に関与するタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株及び該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法を提供することである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、特開平9-275978記載のMT-10822株に導入されている遺伝子組換えプラスミドpPT-DB1上のシュードノカルディア・サーモフィラ由来のDNA断片の塩基配列を詳細に解析した。その結果、以下の1~5の知見を得るに至った。第一に、pPT-DB1上にニトリルヒドラーゼ構造遺伝子(αおよびβサブユニット構造遺伝子)とは異なる第3のオープンリーディングフレーム(以下、ORF3と呼称する)が該DNA断片上に存在し、ORF3が分子量約15900のタンパク質をコードしていることを見出した。第二に、pPT-DB1上のαサブユニットのオープンリーディングフレーム(以下、ORF2と呼称する)、βサブユニットのオープンリーディングフレーム(以下、ORF1と呼称する)およびORF3のみがクローニングされたプラスミドpPT-D1を作製し、同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌がニトリルヒドラーゼ活性を有していることを確認した。第三に、pPT-DB1よりORF1およびORF2のみを有する遺伝子組換えプラスミドpPT-F1を構築した。同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌のニトリルヒドラーゼ活性を測定した結果、同大腸菌からはニトリルヒドラーゼ活性が検出されなかった。一方、菌体内には、αおよびβサブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。第四に、pPT-DB1より、ORF3領域のみがクローニングされたプラスミドpPT-G1を作製し、同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌にはニトリルヒドラーゼ活性が見いだされないことを確認した。第五に、pPT-F1より、lacZプロモーター、ORF1およびORF2を含む領域をPCRにより増幅し、得られた増幅DNA断片をpPT-G1のORF3の3'末端側下流に再クローニングしたプラスミドpPT-H1を作製した。同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌のニトリルヒドラーゼ活性を測定した結果、該大腸菌にはニトリルヒドラーゼ活性が検出された。

【0006】以上の知見より、本発明者らは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼが導入された大腸菌が同活性を示すためには、ORF3領域の存在が必須であり、さらに、上記の第二、第三および第五の知見を併せ考えるとORF3の翻訳産物の存在が必須であると結論した。また、同酵素がαサブユニットおよびβサブユニットにより構成されること(特開平9-275978)、および、ORF1~3の3種類のオープンリーディングフレームを含む最小のDNA断片を大腸菌に導入した場合でも遺伝子組換え大腸菌がニトリルヒドラーゼ活性を示すこと(上記の第二の知見)より、ORF3の翻訳産物は、該ニトリルヒドラーゼの活性化に関与していると結論した。すなわち、ORF3は、シュードノカルディア・サーモフィラ由来の

ニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子座であると結論し、本発明を完成させるに至った。

【0007】すなわち、本発明は、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質およびそれをコードする遺伝子配列を提供するものである。さらに、本発明は、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株、及び、該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いて、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法を提供するものである。

#### 【0008】

【発明実施の形態】以下、本発明の詳細について説明する。

【0009】本発明におけるシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質(以下、単にニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質と呼称する)とは、前述の課題を解決するための手段および後述の実施例のように、該タンパク質の発現の有無がシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化を直接左右する性質を有しているタンパク質のことである。

【0010】本発明におけるニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質とは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のものをその代表例として挙げることができる。尚、近年の分子生物学および遺伝子工学の進歩により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質の分子生物学的な性質やアミノ酸配列等を直接参考にすることにより、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をシュードノカルディア・サーモフィラとは全く別個の微生物株より取得することが可能となり、かつ、比較的容易にもなった。かかる技術水準に鑑み、シュードノカルディア・サーモフィラ以外の微生物株由来であっても、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質は、本発明に包含されるものとする。そのような微生物株としては、ノカルディア(*Nocardia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、ミクロコッカス(*Micrococcus*)属、ロドクロウス(*rhodochrous*)種に代表されるロドコッカス(*Rhodococcus*)属、アシネトバクター(*Acinetobacter*)属、キサントバクター(*Xanthobacter*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、リゾビウム(*Rhizobium*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、エアロモナス(*Aeromonas*)属、シトロバクター(*Citrobacter*)

属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属またはサーモフィラ(*thermophila*)種 JCM3095 株以外のシュードノカルディア(*Pseudonocardia*)属に属する株を好適な例として挙げることができる。

【0011】本発明におけるニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質とは、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列により構成されるものをその代表例として挙げるができる。また、同じ塩基配列の遺伝子を鋳型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主の種類、培養に使用する栄養培地の成分や組成、培養時の温度やpH等によっては、宿主内酵素による翻訳後の修飾などにより、所期の機能は保持しているものの配列表におけるN末端付近のアミノ酸の1個または2個以上が欠失したり、N末端に1個または2個以上のアミノ酸が新たに付加した部分変異タンパク質を産生することがある。さらに、組換えDNA技術の進歩によりタンパク質の機能を実質的に変えることなく比較的容易にその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除もしくは挿入できるようになった。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質とは、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列をそのまま具備するものは言うにおよばず、1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換、欠失、削除もしくは挿入されたアミノ酸配列を有する部分変異タンパク質であっても、それがシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与する場合は本発明に含まれるものとする。

【0012】すなわち、本発明は、配列表の配列番号：1に示される144個のアミノ酸の配列により構成されるニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質である。また、本発明においては、配列表の配列番号：1に示されるアミノ酸配列の一部が置換、欠失、削除または挿入して得られた部分変異タンパク質であり、かつ、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与する場合には、本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質に含まれるものとする。

【0013】本発明におけるニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質とは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来であり、かつ、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列により構成されるものをその代表例として挙げるができる。また、近年の遺伝子工学の進歩により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質のアミノ酸配列を直接参考にすることにより、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をシュードノカルディア・サーモフィラとは全く別個の微生物株より取得することが可能となり、かつ、比較的容易にもなった。かかる技術水準に鑑み、シュードノカルディア・サーモフィラ以外の微生物

株由来であり、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列をそのまま具備する場合または1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換、欠失、削除もしくは挿入されたアミノ酸配列を有する場合であって、かつ、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与する場合には、該タンパク質は、本発明に含まれるものとする。そのような微生物株としては、ノカルディア(*Nocardia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、マイクロコッカス(*Micrococcus*)属、ロドクロウス(*rhodochrous*)種に代表されるロドコッカス(*Rhodococcus*)属、アシネトバクター(*Acinetobacter*)属、キサントバクター(*Xanthobacter*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、リゾビウム(*Rhizobium*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、エアロモナス(*Aeromonas*)属、シトロバクター(*Citrobacter*)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属またはサーモフィラ(*thermophila*)種 JCM3095 株以外のシュードノカルディア(*Pseudonocardia*)属に属する株を好適な例として挙げるができる。

【0014】本発明においては、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の配列が含まれる。本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、本発明の範囲に含まれるものとする。

【0015】本発明においては、配列表の配列番号：1に示される144個のアミノ酸の配列をコードする塩基配列は、本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれる。また、本発明においては、配列表の配列番号：1に示されるアミノ酸配列の一部が置換、欠失、削除または挿入して得られる部分変異タンパク質であり、かつ、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与する場合には、該部分変異タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列も本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

【0016】本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、配列表の配列番号2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列をその代表例として挙げるができる。また、組換えDNA技術の進歩によりタンパク質のアミノ酸配列を実質的に変えることなく比較的容易に翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を他の塩基配列で置換できるようになった。さらに、翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を置換、欠失、削除もしくは挿入することにより、タン

パク質の機能を実質的に変えることなくその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除または挿入させることもできるようになった。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、配列表における配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列をそのまま具備するものは言うにおよばず、そのDNA塩基配列の1個または2個以上の塩基が他の塩基に置換、欠失、削除もしくは挿入された部分変異配列であっても、それがシュドノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質の鋳型として機能する場合には、本発明に包含されるものとする。

【0017】すなわち、本発明は、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であって、配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列により構成されるものを含んでいる。また、本発明においては、配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列の一部を置換、欠失、削除または挿入して得られる塩基配列を有する遺伝子であって、該遺伝子がコードするタンパク質がシュドノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に関与する場合には、本発明のニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子に含まれるものとする。

【0018】本発明においては、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子が挿入された組換えプラスミドを構築することが含まれる。より具体的には、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子が該遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターに挿入されたプラスミドのことである。

【0019】発現に必要な制御領域とは、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む）・リボゾーム結合配列（SD配列）・転写終結配列等を示している。プロモーター配列の具体例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンのtrpプロモーター・ラクトースオペロンのlacプロモーター・ラムダファージ由来のPLプロモーター及びPRプロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター（gnt）・アルカリプロテアーゼプロモーター（apr）・中性プロテアーゼプロモーター（npr）・ $\alpha$ -アミラーゼプロモーター（amy）等が挙げられる。また、lacプロモーターのように独自に改変・設計された配列も利用できる。リボゾーム結合配列としては、本発明のシュドノカルディア本来の配列や大腸菌由来または枯草菌由来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。たとえば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列

をDNA合成により作成してこれを利用してよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 $\rho$ 因子非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター・trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域の組換えプラスミド上での配列順序は、5'末端側上流からプロモーター配列、リボゾーム結合配列、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、転写終結配列の順に並ぶことが望ましい。

【0020】プラスミドベクターの具体例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、Bluescript IISK（+）、pKK223-3、pSC101や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有しているpUB110、pTZ4、pC194、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1、 $\phi$ 105等を挙げることができる。また、2種類以上の宿主内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7を挙げることができる。

【0021】本発明においては、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とニトリルヒドラーゼ遺伝子が同時に挿入された組換えプラスミドを構築することが含まれる。すなわち、両遺伝子が両遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターに挿入された組換えプラスミドのことであり、該組換えプラスミドが任意の宿主に導入されることにより、該酵素の産生および活性化が可能となる組換えプラスミドのことである。具体的には、前述と同じ発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターを選択すればよい。また、その様な制御領域によりニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、ニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニット遺伝子及び $\beta$ サブユニット遺伝子が各々独立のシストロンとして発現されていてもよいし、共通の制御領域によりポリシストロンとして発現されていてもよい。

【0022】本発明のニトリルヒドラーゼ遺伝子とは、シュドノカルディア・サーモフィラ由来の該遺伝子をその代表例として挙げることができる。より具体的には、配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で表される $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子および配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で表される $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子が挙げられる。すなわち、基本的には $\alpha$ サブユニットが618個の塩基配列により構成され、 $\beta$ サブユニットが702個の塩基配列により構成されているニトリルヒドラーゼであるが、組換えDNA技術の進歩により、該酵素のアミノ酸配列を実質的に変えることなく比較的容易に翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を他の塩基配列で置換したり、翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を置換、欠失、削

除もしくは挿入することにより、酵素の作用を実質的に変えることなくその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除または挿入させることもできるようになった。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子とは、配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で示される $\alpha$ サブユニットと配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で示される $\beta$ サブユニットをそのまま具備するものは言うにおよばず、そのDNA塩基配列の1個または2個以上の塩基が他の塩基に置換、欠失、削除もしくは挿入された部分変異配列であっても、それがニトリルヒドラターゼ活性を有するタンパク質の鋳型として機能できる限りは本発明のシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子に包含されるものとする。

【0023】具体的には、特開平9-275978に示されたように、配列表の配列番号：2に記載の塩基配列の729番目から731番目、768番目から770番目、825番目から827番目、942番目から944番目、981番目から983番目、1017番目から1019番目、1029番目から1031番目、1089番目から1091番目、1101番目から1103番目、1137番目から1139番目、1149番目から1151番目、1272番目から1274番目、1293番目から1295番目、1320番目から1322番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列で表される $\alpha$ サブユニット遺伝子を構成要素として有しているニトリルヒドラターゼ遺伝子を挙げることができる。

【0024】すなわち、本発明においては、 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換して得られる $\alpha$ サブユニットを構成要素として有しているニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子が含まれる。

【0025】同様に、配列表の配列番号：2に記載の塩基配列の73番目から75番目、76番目から78番目、337番目から339番目、613番目から615番目、649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列で表される $\beta$ サブユニット遺伝子を構成要素として有しているニトリルヒドラターゼ遺伝子を挙げることができる。

【0026】すなわち、本発明においては、 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目、212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換して得られる $\beta$ サブユニットを構成要素として有しているニトリルヒドラ

ターゼをコードする遺伝子が含まれる。

【0027】また、本発明におけるニトリルヒドラターゼ遺伝子は、前述のシュードノカルディア・サーモフィラ由来の該遺伝子に特に限定されるものではなく、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質により活性化される場合には、他の微生物株由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子も含まれる。そのような微生物株としては、ノカルディア(*Nocardia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、ミクロコッカス(*Micrococcus*)属、ロドクロウス(*rhodochrous*)種に代表されるロドコッカス(*Rhodococcus*)属、アシネトバクター(*Acinetobacter*)属、キサントバクター(*Xanthobacter*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、リゾビウム(*Rhizobium*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、エアロモナス(*Aeromonas*)属、シトロバクター(*Citrobacter*)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属およびサーモフィラ(*thermophila*)種JCM3095株以外のシュードノカルディア(*Pseudonocardia*)属を好適な例として挙げることができる。

【0028】本発明においては、前述の組換えプラスミドを任意の微生物宿主に導入して形質転換体を得ることが含まれる。この際には、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、ニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニット遺伝子及び $\beta$ サブユニット遺伝子を同一のプラスミドベクター上に存在させた組換えプラスミドを使用してもよい、各遺伝子を独立のプラスミドベクター上に存在させた複数の組換えプラスミドを同時に導入してもよい。また、ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるものではなく枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。その様なものの例として、MT-10822(本菌株は、1996年2月7日に茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5785として、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されている。)が挙げられる。

【0029】尚、外来遺伝子の発現に必要な領域を有するプラスミドベクターに本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質コードする遺伝子、および/または、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を挿入して本発明の組換えプラスミドを構築する方法、該組換えプラスミドを所望の宿主に形質転換する際には、「Molecular Cloning 2nd Edition」(T. Maniatisら; Cold Spring Harbor Labo

ratory Press, 1989) 等に記載されている遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を参考にすればよい。

【0030】本発明においては、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とニトリルヒドラターゼ遺伝子を同時に任意の宿主に導入し、得られた形質転換体を一般的な栄養培地で培養して該酵素を産生させ、該酵素を産生している該形質転換株、該形質転換株の培養液、該形質転換株の培養液より得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物を調製し、水性媒体中にてそれらとニトリル化合物を接触させて対応するアミド化合物を製造することが含まれている。該形質転換株の調製に際しては、分子生物学・生物学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を利用して調製すればよい。たとえば、LB培地やM9培地等の通常液体培地（より好ましくはそのような培地成分にFeイオン及びCoイオンを $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上存在させるとよい）に該形質転換株を植菌した後、適当な培養温度（一般的には、 $20^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ ）で生育させればよい。また、該培養液そのものや、該培養液より遠心分離によって分離・回収して得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物を利用することもできる。ここでいう菌体処理物とは、該形質転換菌体の抽出物や磨砕物、該抽出物や磨砕物のニトリルヒドラターゼ活性画分を分離・精製して得られる後分離物、該形質転換菌体や該形質転換菌体の抽出物・磨砕物・後分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物のことを示している。また、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する場合のニトリル化合物としては、本発明のニトリルヒドラターゼが基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、クロトノニトリル、

培地組成	酵母エキストラクト
	ポリペプトン
	NaCl
	塩化コバルト・六水和物
	硫酸第二鉄・七水和物
	pH 7.5

【0034】該湿菌体よりアルカリSDS抽出法によりpPT-DB1 [図-1 (図1)] のプラスミドDNAを調製し、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いてプライマーエクステンション法により挿入断片の全塩基配列を決定した。その結果、挿入断片中に705bp、621bpおよび435bpの塩基配列からなるオープンリーディングフレーム（各々ORF1、ORF2、ORF3と呼ぶ）が5'末端側よりこの順番で確認され、また、それぞれの転写方向も完全に一致していた。翻訳停止コドンを含めたORF1の最も3'末端側の4塩基とORF2の最も5'

$\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリル、エチレンシアンヒドリン、フマロニトリル、マロニトリル、ペンゾニトリル、マンデロニトリル、シアノピラジン、3-シアノピリジン等のニトリル化合物がその代表例として挙げられる。該ニトリル化合物の水性媒体中での濃度は、特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラターゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは $0^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ である。

#### 【0031】

【実施例】以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。尚、各実施例及び比較例におけるHPLC分析は、カラムとして日本分光製のFinepak SIL C18-5 ( $250\times 4.6\phi\text{mm}$ )を用い、4体積%のアセトニトリルを含む10mMリン酸水溶液を展開液として使用した。また、アクリルアミド、アクリロニトリル、アクリル酸は210nmの吸光度により検出した。

【0032】[実施例1] MT-10822株の挿入断片の解析(1)

500mlのパッフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、 $121^{\circ}\text{C}\cdot 20$ 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822株(FERM BP-5785)を一白菌耳植菌し、 $37^{\circ}\text{C}\cdot 130\text{rpm}$ にて16時間培養した。遠心分離( $15000\text{G}\times 15$ 分間)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

#### 【0033】

5.0g/L
10.0g/L
5.0g/L
10.0mg/L
40.0mg/L

末端側の4塩基は重複し、同様に翻訳停止コドンを含めたORF2の最も3'末端側の4塩基とORF3の最も5'末端側の4塩基は重複していた。尚、特開平9-275978にて既に示されたように、ORF1はニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニット遺伝子であり、ORF2は $\alpha$ サブユニット遺伝子である。

【0035】次に、ORF1からORF3までの全領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型としてPCRを実施した。pPT-DB1のプラスミドDNA $1\mu\text{g}$ を鋳型として、配列表の配列番号3記載のプライマー及び配列表の配列番号4記載



プライマーを各々100 pmolとTaq DNAポリメラーゼを5 Uを含む全量100 µlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液10 µlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.8 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.8 kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行った。まず、TE(1 mMのEDTA・2 Naを含む10 mMのトリス塩酸水溶液; pH 8.0)で飽和させたフェノール液1 mlを加え緩やかにかくはんした。遠心分離(3000 rpm、10分)により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4 mlとクロロホルム0.4 mlを加えて再び緩やかにかくはんした後、遠心分離(3000 rpm、10分)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8 mlを加えて再び緩やかにかくはんした後、遠心分離(3000 rpm、10分)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1 MのNaClを含むTE溶液80 µlとエタノール1.7 mlを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離(15000 rpm、20 min、4℃)によりDNA断片の沈澱を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10 µlのTEに溶解した。精製した約1.8 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びSphIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して上記と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10 µlのTEに溶解した。同様に、puc18ベクター上の唯一の制限酵素サイトであるEcoRIおよびSphIにより同ベクターを切断し、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約2.7 kbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して上述と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 µlのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物とpuc18断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-D1[図-2(図2)]を構築した。また、構築さ

れたpPT-D1のEcoRI部位からSphI部位間の挿入断片の全塩基配列を配列表の配列番号2に記載した。

【0036】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-D1をHB101株に導入し、形質転換菌株No. 1を得た。500 mlのバッフル付き三角フラスコに上述と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 µg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No. 1を一白菌耳植菌し、37℃・130 rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000 G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100 mgを200 mlの50 mMのリン酸カリウム水溶液(pH 7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10 ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドのみが存在しており、アクリロニトリル及びアクリル酸は認められなかった。すなわち、転化率及び選抜率は100%であった。

【0037】[比較例1] MT-10822株の挿入断片の解析(2)

ORF1からORF3の途中までの領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型としてPCRを実施した。実施例1で調整したpPT-DB1のプラスミドDNA1 µgを鋳型として、配列表の配列番号3記載のプライマー及び配列表の配列番号5記載プライマーを各々100 pmolとTaq DNAポリメラーゼを5 Uを含む全量100 µlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液10 µlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度0.9重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.6 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.6 kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、増幅DNA断片を精製した。精製した約1.6 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びSphIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10 µlのTEに溶解した。この様にし

て得られた増幅DNA産物と実施例1で調整した約2.7 kbpのpuc18のEcoRI-SphI断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-E1[図-3(図3)]を構築した。

【0038】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-E1をHB101株に導入し、形質転換菌株No. 2を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに実施例1と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No. 2を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は0%であった。一方、培養液より分離された菌体内には、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼのαおよびβサブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。

【0039】[比較例2] MT-10822株の挿入断片の解析(3)

ORF1からORF2までの全領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型としてPCRを実施した。実施例1で調整したpPT-DB1のプラスミドDNA1μgを鋳型として、配列表の配列番号3記載のプライマー及び配列表の配列番号6記載プライマーを各々100pmolとTaqDNAポリメラーゼを5Uを含む全量100μlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液液10μlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度0.9重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.3kbpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.3kbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノー

ル沈澱を行い、増幅DNA断片を精製した。精製した約1.3kbpの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びSphIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物と実施例1で調整した約2.7kbpのpuc18のEcoRI-SphI断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-F1[図-4(図4)]を構築した。

【0040】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-F1をHB101株に導入し、形質転換菌株No. 3を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに実施例1と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No. 3を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は0%であった。一方、培養液より分離された菌体内には、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼのαおよびβサブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。

【0041】[比較例3] MT-10822株の挿入断片の解析(4)

ORF3の全領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型としてPCRを実施した。実施例1で調整したpPT-DB1のプラスミドDNA1μgを鋳型として、配列表の配列番号7記載のプライマー及び配列表の配列番号4記載プライマーを各々100pmolとTaqDNAポリメラーゼを5Uを含む全量100μlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液液10μlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度1.2重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約450bpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約

450bpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1g)を細かく粉砕し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、増幅DNA断片を精製した。精製した約450bpの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びSphIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物と実施例1で調整した約2.7kbpのpuc18のEcoRI-SphI断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-G1[図-5(図5)]を構築した。

【0042】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-G1をHB101株に導入し、形質転換菌株No.4を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに実施例1と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No.4を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は0%であった。

【0043】[実施例2]MT-10822株の挿入断片の解析(5)

pPT-G1プラスミドのORF3領域の3'末端側に、比較例1で作製したpPT-F1のlacZプロモーター、βサブユニットのORF2、αサブユニットのORF1を含む領域をクローニングした。比較例1で調整したpPT-F1のプラスミドDNA1μgを鋳型として、配列表の配列番号8記載のプライマー及び配列表の配列番号9記載プライマーを各々100pmolとTaqDNAポリメラーゼを5Uを含む全量100μlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液10μlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用;アガロース濃

度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2.0kbpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2.0kbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1g)を細かく粉砕し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、増幅DNA断片を精製した。精製した約2.0kbpの増幅DNA断片を制限酵素SphI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。同様に、pPT-G1プラスミド上の唯一の制限酵素サイトであるSphI及びHindIIIにより同プラスミドを切断し、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.1kbpのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片(約0.1g)を細かく粉砕し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物とpPT-G1のSphI-HindIII断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-H1[図-6(図6)]を構築した。

【0044】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-H1をHB101株に導入し、形質転換菌株No.5を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに上述と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No.5を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドのみが存在しており、アクリロニトリル及びアクリル酸は認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は100%であった。

【0045】

【発明の効果】本発明により、シュードノカルディア・

サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質およびそれをコードする遺伝子配列が提供される。さらに、本発明により、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株、及び、該形質転換株を培養して得られる培養液・菌体・菌体処理物を用いて、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法が提供される。また、本発明によれば、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造する際に、遺伝子工学的な手法で該酵素を大量に発現させることが可能となり、これよりアミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストの削減が達成される。

#### 【0046】

##### 【配列表】

##### 配列

Met	Ser	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Leu	Lys	His	Cys	Pro	Thr	Ala	Glu
				5				10						15	
Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Gly	Asp
				20				25						30	
Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Gly	Phe	Asp	Glu	Pro	Trp	Gln	Leu	Arg	Ala	Phe
				35				40						45	
Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Ala	Cys	Arg	Ala	Gly	Arg	Phe	Glu	Trp	Lys	Gln
				50				55						60	
Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Ile	Gly	Glu	Trp	Glu	Arg	Thr	His
				65				70						75	
Asp	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Glu	His	Phe	Val	Ala	Ala
				85				90						95	
Leu	Glu	Ser	Val	Leu	Gly	Glu	Glu	Gly	Ile	Val	Glu	Pro	Glu	Ala	Leu
				100				105						110	
Asp	Glu	Arg	Thr	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Asn	Lys	Asp	His
				115				120						125	
His	Gly	Pro	His	Leu	Glu	Pro	Val	Ala	Val	His	Pro	Ala	Val	Arg	Ser
				130				135						140	
														144	

#### 【0048】配列番号：2

配列の長さ：1762

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Pseudonocardia thermophila

株名：JCM3095

直接の起源

##### 配列

TGAGAGGAGC TCCGCATGAA CGGCGTGTAC GACGTCGGCG GCACCGATGG GCTGGGCCCCG	60
ATCAACCGGC CCGCGGACGA ACCGGTCTTC CGCGCCGAGT GGGAGAAGGT CGCGTTTCGCG	120

#### 【0047】配列番号：1

配列の長さ：144

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Pseudonocardia thermophila

株名：JCM3095

直接の起源

クローン名：pPT-DB1

配列の特徴

特徴を決定した方法：E

他の情報：シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質のアミノ酸配列を示す。

クローン名：pPT-DB1

配列の特徴

特徴を決定した方法：E

他の情報：16番目から717番目はβサブユニット遺伝子の領域

714番目から1331番目はαサブユニット遺伝子の領域

1328番目から1762番目はシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子の領域

ATGTTCCCGG CGACGTTCOG GGCCGGCTTC ATGGGCCTGG ACGAGTTCCG GTTCGGCATC 180  
 GAGCAGATGA ACCCGGCCGA GTACCTCGAG TCGCCGTACT ACTGGCACTG GATCCGCACC 240  
 TACATCCACC ACGGCGTCOG CACCGGCAAG ATCGATCTCG AGGAGCTGGA GCGCCGCACG 300  
 CAGTACTACC GGGAGAACC CGACGCCCCG CTGCCCAGC ACGAGCAGAA GCCCGAGTTG 360  
 ATCGAGTTCG TCAACCAGGC CGTCTACGGC GGGCTGCCCC CAAGCCGGGA GGTCCGACCGA 420  
 CCGCCCAAGT TCAAGGAGGG CGACGTGGTG CGGTTCTCCA CCGCGAGCCC GAAGGGCCAC 480  
 GCCCGGGCGG CGCGGTACGT GCGGGGCAAG ACGGGGACGG TGGTCAAGCA CCACGGCGCG 540  
 TACATCTACC CGGACACCGC CGGCAACGGC CTGGGCGAGT GCCCGAGCA CCTCTACACC 600  
 GTCCGCTTCA CGGCCCAGGA GCTGTGGGGG CCGGAAGGGG ACCCGAATC CAGCGTCTAC 660  
 TACGACTGCT GGGAGCCCTA CATCGAGCTC GTOGACACGA AGCGGGGCGC GGCATGACCG 720  
 AGAACATCCT GCGCAAGTCG GACGAGGAGA TCCAGAAGGA GATCAACGGC CGGTCGAAGG 780  
 CCCTGGAGTC GATGCTCATC GAACAGGGCA TCTCACCAC GTCGATGATC GACCGGATGG 840  
 CCGAGATCTA CGAGAACGAG GTCGGCCCGC ACCTCGGCGC GAAGGTCGTC GTGAAGGCCT 900  
 GGACCGACCC GGAGTTCAAG AAGCGTCTGC TCGCCGACGG CACCGAGGCC TGCAAGGACC 960  
 TCGGCATCGG CGGCCTGCAG GCGGAGGACA TGATGTGGGT GGAGAACACC GACGAGGTCC 1020  
 ACCACGTCGT CGTGTGCACG CTCTGCTCCT GCTACCCGTG GCCGGTGTG GGGTGCCGC 1080  
 CGAACTGGTT CAAGGAGCGC CAGTACCGCT CCGCGTGGT GCGTGAGCCC CGGACGTGC 1140  
 TCAAGGAGGA GTTCGGCTTC GAGGTCCCGC CGAGCAAGGA GATCAAGGTC TGGGACTCCA 1200  
 GCTCCGAGAT GCGCTTCGTC GTCCTCCCGC AGCGCCCGC GGGCACCGAC GGTGGAGCG 1260  
 AGGAGGAGCT CGCCACCCTC GTCACCCCGC AGTCGATGAT CGGCGTCGAA CCGGCGAAGG 1320  
 CGGTGCGGTG AGCGCCGAGG CGAAGGTCCG CCTGAAGCAC TGCCCCACGG CCGAGGACCG 1380  
 GCGGGCGGCC GACGCGCTGC TCGCGCAGCT GCGCGGCGG GACCGCGCGC TCGACCGCGG 1440  
 CTTCGACGAG CCGTGGCAGC TCGGGGCGTT CGCGCTGGCG GTCGCGGCGT GCAGGGCGGG 1500  
 CCGGTTGAG TGAAGCAGC TGCAGCAGGC GCTGATCTCC TCGATCGGG AGTGGGAGCG 1560  
 CACCCACGAT CTCGACGATC CGAGCTGGTC CTACTACGAG CACTTCGTCG CCGCGCTGGA 1620  
 ATCGTGCTC GCGGAGGAAG GGATCGTCGA GCGGAGGCG CTGGACGAGC GCACCGCGGA 1680  
 GGTCTTGCC AACC CGCCGA ACAAGGATCA CCATGGACCG CATCTGGAGC CCGTCGCGT 1740  
 CCACCGGCGC GTGCGGTCCT GA 1762

【0049】配列番号：3

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

CGAATTCTGA GAGGAGCTCC GCATGAACG

29

【0050】配列番号：4

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA GGACCGCAGC GCCGGGTG

28

【0051】配列番号：5

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA GATCGAGGAG ATCAGCGC

28

【0052】配列番号：6

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA CCGGACCGCC TTCGCGG

28

【0053】配列番号：7

配列の長さ：45

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGAATTCTGA GAGGAGCTOC GCGTGAGCGC CGAGGCGAAG GTCCG

45

【0054】配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCATGCCAT TAATGCAGCT GGCACGA

27

【0055】配列番号：9

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAAGCTTTCA GATCGAGGAG ATCAGCGC

28

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpPT-DB1の制限酵素切断点地図を示す。

【図2】プラスミドpPT-D1の制限酵素切断点地図を示す。

【図3】プラスミドpPT-E1の制限酵素切断点地図を示す。

【図4】プラスミドpPT-F1の制限酵素切断点地図を示す。

【図5】プラスミドpPT-G1の制限酵素切断点地図を示す。

【図6】プラスミドpPT-H1の制限酵素切断点地図を示す。

【符号の説明】

b l a : β-ラクタマーゼをコードする遺伝子を示す。

C o l E1-O r i : C o l E1系の複製開始部位を示

す。

l a c Z : p U C 18由来のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

NHα : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼのαサブユニットをコードする遺伝子を示す。

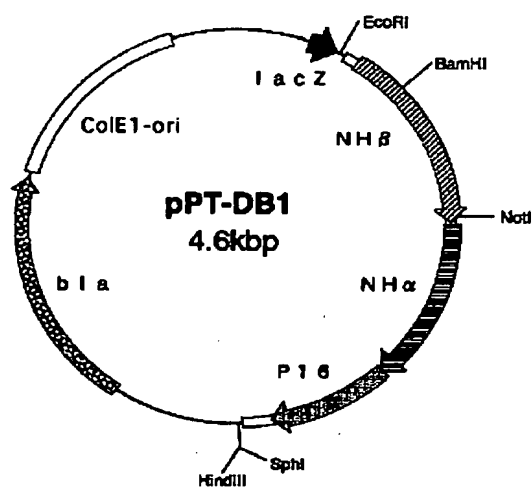
NHβ : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼのβサブユニットをコードする遺伝子を示す。

P 1 6 : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子を示す。

P 1 6 (一部) : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子の部分領域であることを示す。

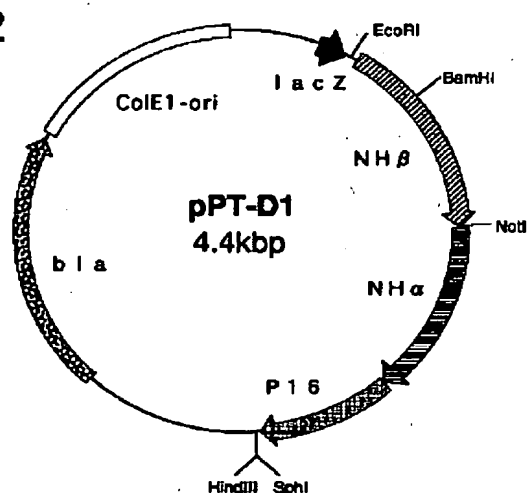
【図1】

図-1



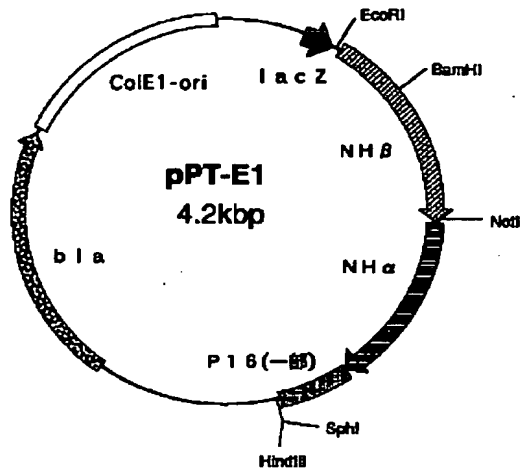
【図2】

図-2



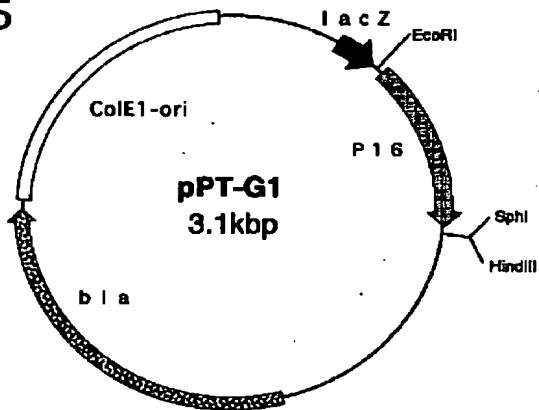
【図3】

図-3



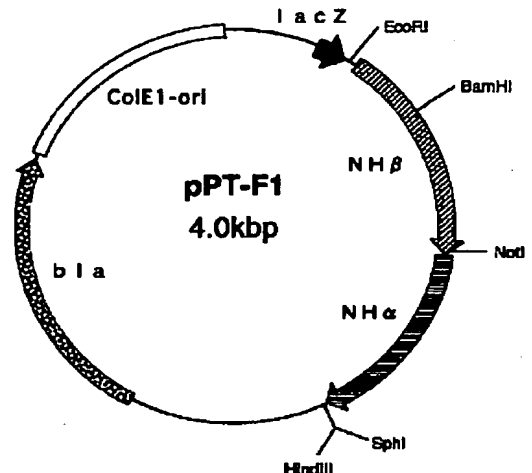
【図5】

図-5



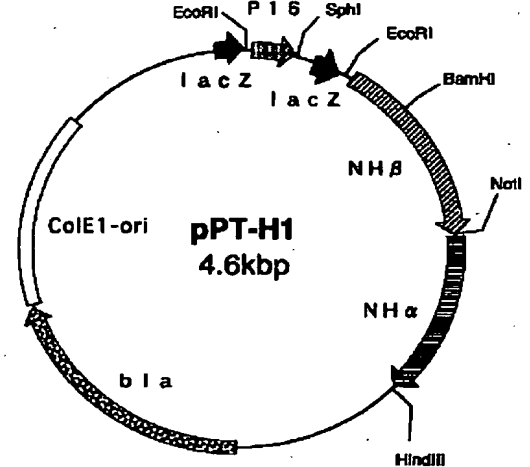
【図4】

図-4



【図6】

図-6



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

//(C12N 15/09

C12R 1:01)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

ZNA

F I

(72) 発明者 肉丸 誠也

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内

(72) 発明者 中村 武史

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内